



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Bartol Božić

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

KEMIJA VIDA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Đani Škalamera

Zagreb, 2018.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

11. svibnja 2018.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

13. srpnja 2018.

Mentor rada: doc. dr. sc. Đani Škalamera

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Od fotona do slike u mozgu.....	1
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	6
2.1. Fotoizomerizacija 11-<i>cis</i>-retinala.....	6
2.1.1. Elektronska stanja i fotokemija – osnovni pojmovi.....	6
2.1.2. Fotoizomerizacija retinala.....	8
2.2. Rodopsin	12
2.2.1. Receptori spregnuti s G-proteinom.....	12
2.2.2. Struktura i funkcija rodopsina	13
2.2.3. Desenzitizacija rodopsina	17
2.3. Transducin.....	19
2.4. cGMP-fosfodiesteraza.....	20
2.5. Hiperpolarizacija	21
2.5.1. Prijenos tvari preko membrane.....	21
2.5.2. Na^+/K^+ -ATP-aza.....	22
2.5.3. Ca^{2+} – sekundarni glasnik	23
2.6. Gvanilat ciklaza.....	25
2.7. Retinoidni ciklus.....	26
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	29

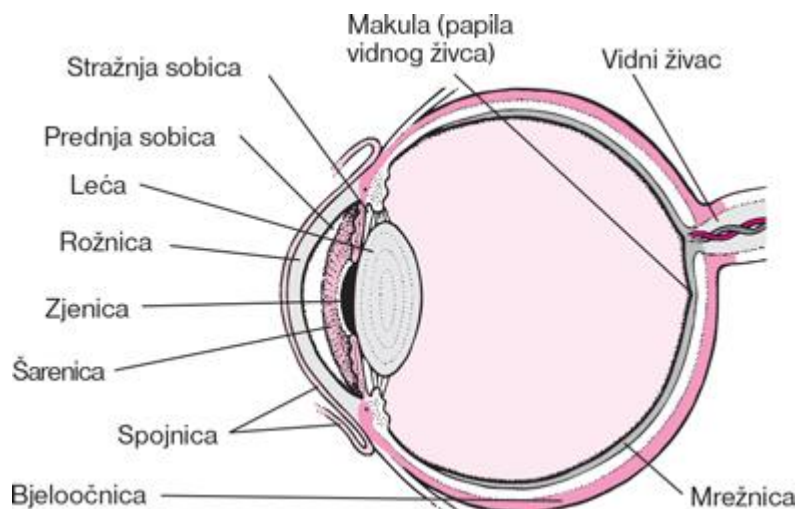
§ Sažetak

Vid je jedno od pet osjetila pomoću kojeg živi organizmi primaju informacije iz svoje okoline. Ljudima je vid najbitnije osjetilo jer pomoću njega primaju gotovo 80% ukupnih informacija iz okoline. Od apsorpcije fotona u mrežnici oka do stvaranja slike u vidnoj kori mozga, dolazi do niza (bio)kemijskih reakcija koje započinju brзом i efikasnom fotokemijskom reakcijom. Te reakcije odvijaju se u specijaliziranim senzornim neuronima: štapićima i čunjićima. Štapići su dovoljno osjetljivi da mogu detektirati i jedan jedini foton, ali ne mogu razlikovati boje, dok se čunjići aktiviraju pri jačem intenzitetu svjetlosti te omogućavaju raspoznavanje boja. Kromofor zadužen za apsorpciju fotona u vidljivom dijelu spektra elektromagnetskog zračenja je 11-*cis*-retinal. 11-*cis*-Retinal s apoproteinom opsinom tvori protoniranu Schiffovu bazu koja se naziva rodopsin i nalazi se u štapićima. U čunjićima je 11-*cis*-retinal vezan na drugačiji apoprotein, što uzrokuje promjenu valne duljine apsorpcijskog maksimuma, a to je ključno za raspoznavanje boja. Prva reakcija u procesu vida je fotoizomerizacija 11-*cis*-retinala u *trans*-retinal (stereoizomer koji ima sve dvostruke veze u *trans* konfiguraciji). Promjena konfiguracije 11-*cis*-retinala uzrokuje značajnu promjenu geometrije cijele molekule rodopsina. Rodopsin pripada skupini receptora spregnutih s G-proteinom te fotoizomerizacijom započinje enzimska kaskada. Aktivni rodopsin aktivira G-protein transducin, koji u aktivnom obliku pojačava aktivnost cGMP-fosfodiesteraze, što dovodi do smanjenja koncentracije cGMP-a u stanici. Smanjena koncentracija cGMP-a uzrokuje zatvaranje ionskih kanala za ione Na^+ i Ca^{2+} , dolazi do hiperpolarizacije membrane i otpuštanja neurotransmitera u sinaptičkom dijelu senzornih neurona te prijenosa živčanog signala. Stanica ima niz načina pomoću kojih kontrolira trajanje prijenosa vizualnog signala i stanje u stanici kad signala više nema. Budući da u prvoj reakciji fotoizomerizacije nastaje *trans*-retinal, potrebno ga je nakon prijenosa signala ponovno prevesti u 11-*cis*-retinal i vezati na opsin, kako bi se dobio funkcionalni rodopsin spreman za novi krug detekcije vizualnog signala. Ta regeneracija 11-*cis*-retinala događa se u retinoidnom ciklusu nakon detekcije i prijenosa vizualnog signala. Nakon retinoidnog ciklusa stanica je spremna za detekciju novog vizualnog signala.

§ 1. UVOD

1.1. Od fotona do slike u mozgu

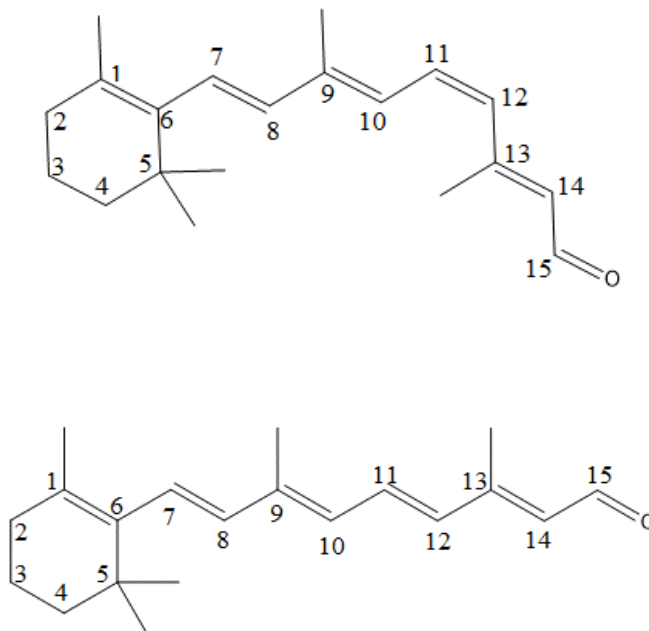
Vid, sluh, njuh, dodir i okus su pet osjetila pomoću kojih ljudi primaju informacije iz okoline. Daleko najviše informacija, oko 80%, čovjek iz svoje okoline prima upravo osjetilom vida. Osim ljudi, mnogi drugi organizmi također koriste vid za percepciju svoje okoline. Između dolaska fotona do oka i stvaranja slike u vidnoj kori mozga, u stanicama oka dolazi do brojnih kemijskih reakcija. Za detekciju elektromagnetskog zračenja u vidljivom dijelu spektra i prenošenje primljenog vizualnog signala zaduženi su specijalizirani senzorni neuroni: čunjići i štapići. Budući da su štapići puno brojnije stanice od čunjića, bolje su istraženi te će se u tekstu podrazumijevati da se govori o štapićima ako nije drugačije navedeno. Mrežnica (vidljiva na slici 1) je s (bio)kemijskog gledišta najbitniji dio oka. Upravo se u tom dijelu oka nalaze štapići i čunjići, ključne fotoreceptorske stanice, ali i mnogi drugi dijelovi mrežnice bitni su za prijenos živčanog signala i regeneraciju rodopsina, o čemu će biti više govora kasnije kroz tekst. Čunjići i štapići su izduženi, tanki senzorni neuroni koji se sastoje od dva dijela: vanjskog i unutarnjeg. Vanjski dio je fotosenzibilni dio, a obje vrste stanica završavaju sinapsom. U vanjskom dijelu nalaze se stotine, čak i tisuće spoljštenih, membranskih struktura gusto naslaganih jedne na druge, koje se nazivaju fotoreceptorski diskovi. U membranama diskova u štapićima nalazi se rodopsin, molekula koja se sastoji od proteinskog dijela opsina i prostetičke skupine 11-*cis*-retinala. Na taj način, znatno je povećana površina membrana u fotoreceptorskim stanicama pa samim time i broj fotoreceptorskih molekula, a gusto pakiranje povećava efikasnost apsorpcije fotona. Konceptualno, ovakva strukturna organizacija postoji i kod tilakoida u kloroplastima kod kojih je također bitno da apsorpcija svjetlosti bude maksimalna moguća. Unutarnji dio čunjića i štapića sadrži jezgru, mnoštvo mitohondrija zaduženih za proizvodnju adenozin trifosfata (ATP-a) koji ima važnu ulogu u prijenosu živčanog signala, te druge stanične organele. Štapići mogu detektirati vrlo male razine osvjetljenja, čak jedan jedini foton, ali ne mogu razlikovati boje. Čunjići su manje osjetljivi na svjetlost, ali mogu razlikovati boje.



Slika 1. Građa oka. U mrežnici se događa niz kemijskih reakcija koje omogućavaju detekciju i prijenos svjetlosnog signala, stoga je mrežnica s (bio)kemijske strane najbitnije tkivo oka u procesu vida.¹

Natrij-kalij adenzin trifosfataza ($\text{Na}^+\text{K}^+-\text{ATP-aza}$) je vrsta aktivnog prenositelja, koji za svaka tri Na^+ -iona prenesena iz citoplazme u međustanični prostor unosi dva K^+ -iona iz međustaničnog prostora u citoplazmu. Kod čunjića i štapića, $\text{Na}^+\text{K}^+-\text{ATP-aza}$ je kao i u drugim vrstama neurona zaslužna za stvaranje elektrokemijskog gradijenta iona Na^+ i K^+ , što dovodi do stvaranja membranskog potencijala. Ako dva dijela otopine odvojena membranom (propusnom, polupropusnom ili nepropusnom) sadrže različite koncentracije otopljenih tvari, tad postoji koncentracijski gradijent. U slučaju da su otopljene tvari ioni, koncentracijski gradijent uzrokuje nastajanje električnog gradijenta zbog različite količine naboja s dviju strana membrane. Električni i koncentracijski gradijent zajedno čine elektrokemijski gradijent. Različita količina naboja stvara različit električni potencijal s dviju strana membrane. Membranski potencijal je razlika električnih potencijala citoplazmatskog i međustaničnog dijela. U staničnoj membrani u vanjskom dijelu čunjića i štapića nalaze se ionski kanali koji propuštaju ione Na^+ i Ca^{2+} , što također utječe na membranski potencijal. Otvorenost kanala za ione Na^+ i Ca^{2+} kontrolirana je koncentracijom gvanozin 3',5'-cikličkog monofosfata (cGMP-a). Pri velikoj koncentraciji cGMP-a, ti kanali su otvoreni. Koncentracija Ca^{2+} -iona u citoplazmi ovisi i o membranskom prenositelju koji se naziva $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}-\text{K}^+$ izmjenjivač te izbacuje Ca^{2+} -ione iz stanice. Utjecajem $\text{Na}^+\text{K}^+-\text{ATP-aze}$, kanala propusnih za ione Na^+ i Ca^{2+}

te $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}-\text{K}^+$ izmjenjivača stvara se ravnotežni membranski električni potencijal (V_m) koji prije apsorpcije fotona iznosi -45 mV .



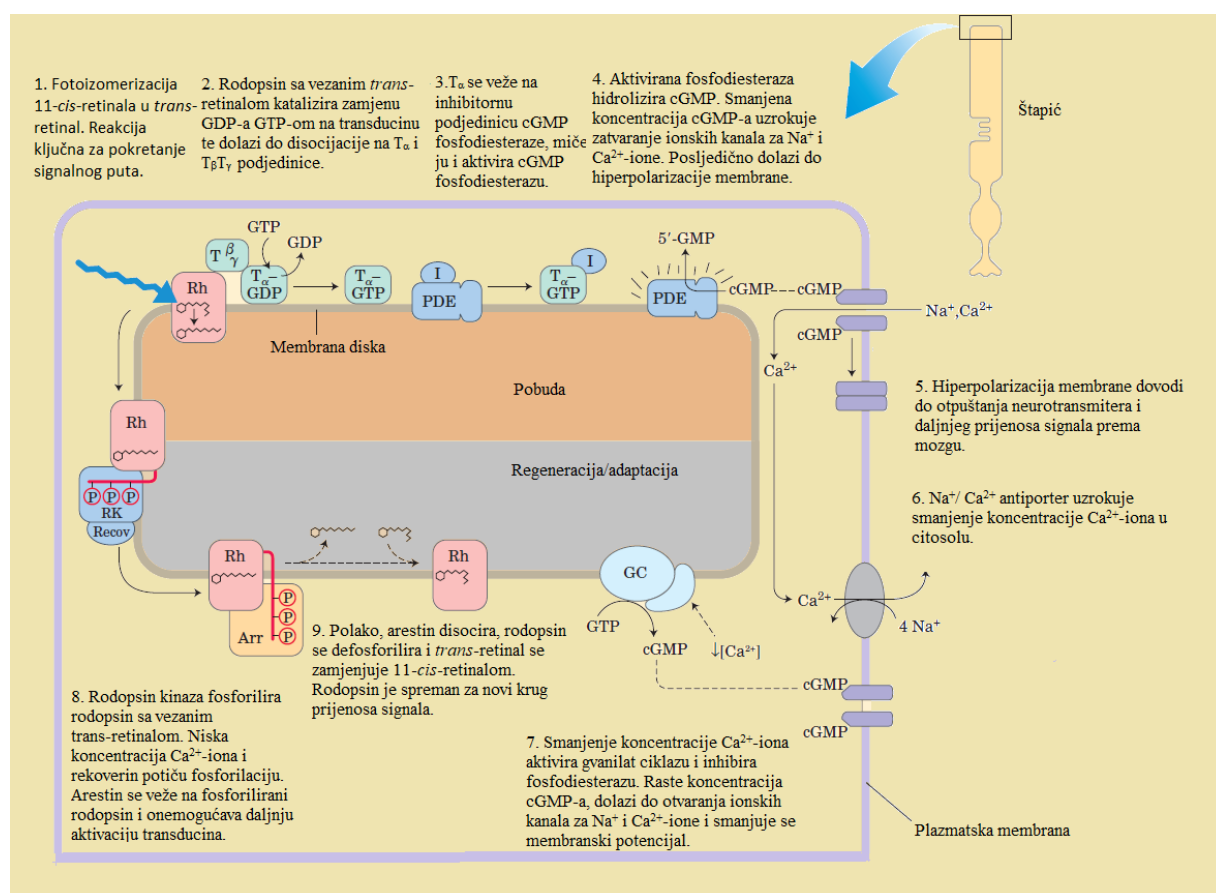
Slika 2. 11-*cis*-Retinal (gore), *trans*-retinal (dolje), s uobičajenim lokantima na ugljikovim atomima. Promjena konfiguracije dvostruke veze između ugljikovih atoma C11 i C12 uzrokuje značajnu promjenu geometrije cijele molekule.

Rodopsin pripada skupini receptora spregnutih s G-proteinom. Apsorpcijom elektromagnetskog zračenja u vidljivom dijelu spektra, dolazi do fotoizomerizacije, pri čemu 11-*cis*-retinal izomerizira u *trans*-retinal (stereoizomeri su prikazani na slici 2). Fotoizomerizacija znatno mijenja geometriju molekule retinala te se posredno mijenja geometrija cijele molekule rodopsina, što dovodi do aktivacije G-proteina transducina. Aktivni rodopsin katalizira zamjenu gvanozin difosfata (GDP-a) gvanozin trifosfatom (GTP-om) na transducinu (T).

Transducin je heterotrimerni G-protein koji se sastoji od T_α , T_β i T_γ podjedinica. Zamjenom GDP-a GTP-om, heterotrimer disocira na T_α i $T_\beta T_\gamma$ podjedinice. T_α -GTP podjedinica aktivira cGMP-fosfodiesterazu (PDE) koja zatim hidrolizira cGMP i posljedično smanjuje koncentraciju cGMP-a u citoplazmi. Smanjenje koncentracije cGMP-a uzrokuje zatvaranje

ionskih kanala za ione Na^+ i Ca^{2+} , ali $\text{Na}^+\text{K}^+-\text{ATP-aze}$ i $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}-\text{K}^+$ izmjenjivači su i dalje funkcionalni, zbog čega dolazi do hiperpolarizacije. Membranski potencijal pada s -45 mV na -75 mV , što uzrokuje otpuštanje neurotransmitera, zatim se preko povezujućih neurona, ganglijskih neurona i optičkog živca živčani signal prenosi do vidne kore mozga. Bitno je podražaj i prijenos signala moći zaustaviti kad signal prođe, kako mozak ne bi konstantno primao istu informaciju. O kontroli trajanja podražaja bit će govora kasnije u tekstu.

U ovom radu detaljno će biti obrađena fotoizomerizacija 11-*cis*-retinala koja je prva, samim time i ključna reakcija u procesu vida. Bit će objašnjeno zašto baš 11-*cis*-retinal ima ulogu kromofora, a ne neki drugi stereoizomer retinala, i kako organizam postiže selektivnost prema nastajanju 11-*cis*-retinala. Za proces vida bitne su enzimske reakcije u stanicama mrežnice koje osiguravaju zadovoljavajuću brzinu cijelog procesa, pojačavaju primarni signal, te reguliraju cijeli signalni put. U složenoj enzimskoj kaskadi (slika 3) svaki enzim prevede velik broj molekula supstrata u molekule produkta čime se znatno pojačava primarni signal. Zbog toga, jedan foton može uzrokovati promjenu membranskog potencijala za oko 1 mV . Osim primarne detekcije elektromagnetskog zračenja i prijenosa signala do vidne kore mozga, vrlo je bitno regenerirati molekule 11-*cis*-retinala koje su izomerizirale u *trans*-retinal, kako bi se mogao primiti novi vizualni podražaj. Proces regeneracije odvija se u nekoliko različitih vrsta stanica. Oči tijekom života bivaju izložene širokom rasponu svjetlosnog intenziteta te mogu satima biti izložene vizualnom podražaju, stoga je bitno da su procesi fotoizomerizacije, prijenosa signala i regeneracije 11-*cis*-retinala brzi i precizno regulirani.



Slika 3. Fotoizomerizacijom 11-*cis*-retinala u *trans*-retinal započinje niz kemijskih reakcija u vanjskom segmentu štapića, koje dovode do hiperpolarizacije membrane i daljnjeg prijenosa vizualnog signala prema vidnoj kori mozga. Enzimi omogućavaju preciznu regulaciju cijelog procesa.²

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Fotoizomerizacija 11-*cis*-retinala

2.1.1. Elektronska stanja i fotokemija – osnovni pojmovi

Born–Oppenheimerova aproksimacija tretira jezgre kao da miruju, što je opravdano činjenicom da se elektroni zbog puno manje mase gibaju puno brže od jezgara u molekuli. Zbog te aproksimacije, moguće je ukupnu valnu funkciju sustava napisati kao umnožak nuklearne i elektronske valne funkcije, te ukupnu Schrödingerovu jednadžbu rastaviti na elektronsku i nuklearnu. Rješavanjem elektronske Schrödingerove jednadžbe dobivaju se parovi elektronskih valnih funkcija i pripadajućih energija. Elektronska energija ovisi o položajima svih jezgri. Konstruiranjem grafičkog prikaza ovisnosti elektronske energije o položajima jezgri dobiva se ploha potencijalne energije (PPE). Ploha potencijalne energije može se prema potrebi konstruirati tako da se svim stupnjevima slobode osim jednog pridoda vrijednost koja minimizira ukupnu energiju, zatim se konstruira dvodimenzionalni prikaz ovisnosti energije o vrijednostima preostalog stupnja slobode. Osnovno i pobuđena elektronska stanja razlikuju se u valnim funkcijama i pripadajućim energijama, stoga je za promatranje osnovnog i nekog od pobuđenih stanja potrebno koristiti različite, odgovarajuće plohe potencijalne energije.

Multiplicitet sustava definira se kao $2S+1$ gdje je S ukupni elektronski spinski kvantni broj. Kad su svi elektroni u sustavu spareni ($S=0$), radi se o singletnom stanju. Kad postoje dva nesparena elektrona ($S=1$), radi se o tripletnom stanju. Između osnovnog i pobuđenog stanja mogući su prijelazi. Vjerojatnost određenog prijelaza naziva se oscilatorska moć. Postoji skup izbornih pravila pomoću kojih se kvalitativno može predvidjeti vjerojatnost nekog prijelaza. Izborna pravila uključuju: multiplicitet stanja između kojih se događa prijelaz (npr. $S_0 \leftarrow S_1$ je dozvoljen prijelaz, a $S_0 \leftarrow T_1$ zabranjen pa se potonji posljedično odvija mnogo sporije); preklapanje elektronskih gustoća orbitala između kojih prelazi elektron (npr. dozvoljen je prijelaz $\pi \leftarrow \pi^*$ jer se orbitale prostorno prekrivaju dok je prijelaz $n \leftarrow \pi^*$ zabranjen jer su te orbitale ortogonalne); paritetu (dozvoljeni su prijelazi među stanjima različitog pariteta, tj. orbitala koje imaju različitu simetriju s obzirom na središte simetrije, npr. dozvoljeni su prijelazi $g \leftarrow u$ i $u \leftarrow g$, ali $u \leftarrow u$ i $g \leftarrow g$ nisu dozvoljeni, oznake g i u dolaze od njemačkog *gerade* – simetrično i *ungerade* – antisimetrično); moment kutne količine gibanja (prijelaz je

dozvoljeniji što je manja razlika geometrije molekule u osnovnom i pobuđenom stanju, tj. što je manja promjena momenta kutne količine gibanja). Iako je neki prijelaz zabranjen, postoji vjerojatnost da se on dogodi. Zabranjeni prijelazi su puno manje vjerojatni od dozvoljenih. Prijelazi između stanja različitih multipliciteta nazivaju se međusustavnim križanjem (npr. $S_1 \rightarrow T_1$). Prijelaz molekule iz pobuđenog tripletnog stanja u osnovno singletno znatno je sporiji od prijelaza molekule iz pobuđenog singletnog u osnovno singletno stanje. Općenito, prijelazi u kojima dolazi do promjene multipliciteta su sporiji, što za posljedicu ima duže vrijeme života pobuđenih stanja, nego što je to slučaj kod prijelaza koji uključuju stanja istog multipliciteta. Fotokemijski procesi odvijaju se iz nekog od pobuđenih stanja, najčešće S_1 ili T_1 , i za njih je vrlo važno vrijeme života pojedinih pobuđenih stanja pa je bitno dolazi li do promjene multipliciteta uslijed pobude molekule ili ne.

Da bi se dogodila neka kemijska reakcija, to jest da bi iz reaktanata nastali produkti, sustav mora imati određenu energiju. Između reaktanata i produkata nalazi se energetska barijera koju je potrebno savladati da bi došlo do kemijske reakcije. Često se energetska barijera može savladati povišenjem temperature, odnosno energija potrebna za odvijanje kemijske reakcije osigurava se toplotom. Neke kemijske reakcije koje imaju energetska barijeru preveliku da se savlada termičkom energijom ili koje imaju termički nestabilne reaktante i / ili produkte, mogu se odvijati koristeći energiju elektromagnetskog zračenja. Takve reakcije nazivaju se fotokemijske reakcije. Većina fotokemijskih reakcija događa se nakon pobude elektromagnetskim zračenjem u ultraljubičastom (UV) ili vidljivom dijelu spektra.

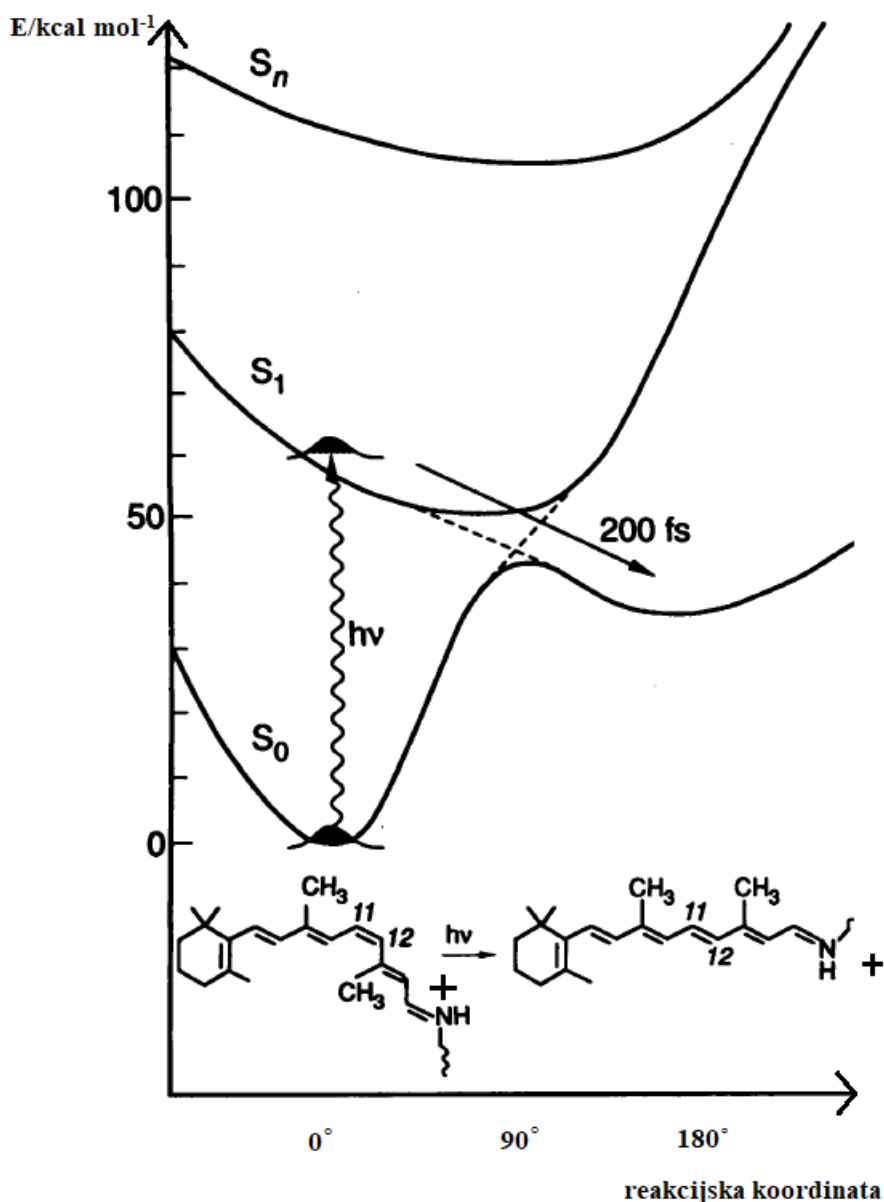
Iako se možda čini očitim, Grotthus-Draperovo načelo kaže da je fotokemijski aktivno samo ono elektromagnetsko zračenje kojeg su molekule apsorbirale. Čak ni svo zračenje koje molekule apsorbiraju neće dovesti do nastajanja fotoprodukta, zbog čega se definira kvantno iskorištenje. Kvantno iskorištenje (ϕ) analogno je klasičnom iskorištenju reakcije, a definira se kao omjer množine produkta nastalog fotoreakcijom i množine fotona kojeg su molekule reaktanta apsorbirale. Kvantno iskorištenje zapisano formulom glasilo bi:

$$\phi = \frac{n \text{ (fotoprodukta)}}{n \text{ (hv, apsorbirano)}}$$

U pravilu je kvantno iskorištenje neki broj između 0 i 1. Međutim, ako fotokemijskom reakcijom nastane radikalska vrsta, dolazi do lančane reakcije i kvantno iskorištenje može biti čak i reda veličine 10^6 .

2.1.2. Fotoizomerizacija retinala

Apoprotein opsin s vezanim 11-*cis*-retinalom tvori funkcionalni rodopsin koji može detektirati svjetlosni signal. Fotoizomerizacijom 11-*cis*-retinala u *trans*-retinal značajno se mijenja geometrija molekule. U navedenoj reakciji izomerizacije, dvostrukoj vezi između C11 i C12 ugljikovih atoma mijenja se konfiguracija. Na slici 4 vidljiv je energetski dijagram fotoizomerizacije s pripadajućim izomerima. Reakcijska koordinata predstavlja vrijednost torzijskog kuta koji je definiran ugljikovim atomima C11, C12 i s po jednim vodikovim atomom na svakom od ta dva ugljikova atoma. U osnovnom singletnom stanju (S_0) molekula se nalazi u minimumu plohe potencijalne energije kad je vrijednost torzijskog kuta 0° (*cis* konfiguracija) ili 180° (*trans* konfiguracija). Apsorpcijom elektromagnetskog zračenja 11-*cis*-retinal se pobuđuje u prvo pobuđeno singletno stanje (S_1). Međutim, u S_1 stanju molekula se ne nalazi u minimumu PPE kad je vrijednost torzijskog kuta 0° , stoga dolazi do rotacije torzijskog kuta za 90° kako bi molekula ostvarila najstabilniju geometriju. Pri vrijednosti torzijskog kuta od 90° , PPE koja odgovara S_1 stanju ima minimum, a PPE koja odgovara S_0 stanju maksimum, pa se energije tih ploha pri toj vrijednosti kuta međusobno jako približavaju. Zbog vrlo bliskih vrijednosti energija S_0 i S_1 stanja pri vrijednosti torzijskog kuta od 90° , PPE koje odgovaraju tim stanjima pri toj vrijednosti kuta tvore stožasti presjek (prikazano na slici 4 isprekidanim linijama). Postojanje stožastog presjeka omogućava brz prijelaz molekule iz pobuđenog u osnovno stanje. No prijelaskom iz energetskog minimuma pobuđenog stanja u osnovno stanje, molekula dolazi u prijelazno stanje PPE osnovnog stanja. Iz prijelaznog stanja molekula može prijeći natrag u reaktant, 11-*cis*-retinal, ili dati produkt fotokemijske reakcije, *trans*-retinal. Apsorpcijom zračenja i prijelaskom molekule u pobuđeno stanje dolazi do smanjenja reda dvostrukih veza, što je popraćeno njihovim produljivanjem. Najslabija od svih π veza u molekuli 11-*cis*-retinala upravo je veza između atoma C11 i C12 pa se mijenja konfiguracija upravo te veze. Nastajanjem *trans*-retinala u osnovnom (S_0) stanju, ponovno se povećava red veze i onemogućena je daljnja rotacija oko dvostruke veze između C11 i C12, a time i ponovna izomerizacija.³



Slika 4. Energetski dijagram izomerizacije rodopsina u batorodopsin. Batorodopsin je prvi međuprodukt koji vodi prema nastajanju aktivnog metarodopsina II.

11-*cis*-Retinal s opsinom tvori protoniranu Schiffovu bazu. Reakcijska koordinata predstavlja vrijednost torzijskog kuta koji je definiran ugljikovim atomima C11 i C12 te s po jednim vodikovim atomom na svakom od ta dva ugljikova atoma.⁴

Fotokemijska reakcija izomerizacije 11-*cis*-retinala, prostetičke skupine rodopsina, u *trans*-retinal prva je i najvažnija reakcija u procesu vida, jer pokreće daljnji prijenos informacije prema mozgu. Promjenom konfiguracije kromofora 11-*cis*-retinala kovalentno vezanog na

proteinski dio rodopsina mijenja se konformacija proteina, aktivira se G-protein transducin i nastavlja se prijenos vizualnog signala pomoću niza proteina i ionskih kanala. Energija potrebna za izomerizaciju 11-*cis*-retinala u *trans*-retinal prevelika je da bi mogla biti osigurana termičkom energijom u živom organizmu (kod ljudi $T \sim 310$ K). To ima važan biološki značaj. Kad bi termička energija bila dovoljna za tu izomerizaciju, mozak bi konstantno primao signal koji zapravo ne postoji i cijeli ovaj koncept ne bi bio upotrebljiv za prijenos vizualnog signala. Vrijeme polureakcije termičke izomerizacije 11-*cis*-retinala iznosi 420 godina.⁵

Kromofor rodopsina, 11-*cis*-retinal, ima apsorpcijski maksimum na 500 nm, vrlo visoko kvantno iskorištenje $\phi_{500} = 0,65 \pm 0,01$, a sama reakcija izomerizacije traje svega 200 fs te je jedna od najbržih poznatih fotoreakcija. Kod većine fotokemijskih reakcija, kvantno iskorištenje ne ovisi o valnoj duljini apsorbiranog zračenja, ali 11-*cis*-retinal je iznimka te ima najveće kvantno iskorištenje pri apsorpciji zračenja valne duljine 500 nm. Kvantno iskorištenje $\phi_{500} = 0,65 \pm 0,01$ zapravo znači da će od 100 molekula koje su apsorbirale zračenje, u prosjeku njih 65 dati fotoprodukt, a ostatak će se radijativnim ili neradijativnim putem vratiti u reaktant u osnovnom stanju. 11-*cis*-Retinal i proteinski dio opsin u rodopsinu čine protoniranu Schiffovu bazu. Međutim, ako se 11-*cis*-retinal u protoniranoj Schiffovoj bazi promatra u otapalu kao što je metanol, ima niže kvantno iskorištenje fotoizomerizacije i reakcija je sporija, što pokazuje koliko je bitno proteinsko okruženje za efikasnost fotokemijske reakcije. Kod molekule 11-*cis*-retinala, maksimum PPE za osnovno singletno (S_0) i minimum PPE za prvo pobuđeno singletno stanje (S_1) u jednoj točki se jako približavaju tvoreći stožasti presjek. Stožasti presjek ključan je za brzinu izomerizacije.⁶

Za reaktivnost molekula, ali i za fotokemijske reakcije najvažnije je proučiti granične orbitale. Granične orbitale su energetske najviša popunjena molekularna orbitala, HOMO (engl. *highest occupied molecular orbital*) i energetske najniža nepopunjena molekularna orbitala, LUMO (engl. *lowest unoccupied molecular orbital*). Energetska razlika HOMO-LUMO bitna je za fotokemijske reakcije jer se između tih orbitala događaju prijelazi između osnovnog i prvog pobuđenog stanja. Povećanjem broja konjugiranih dvostrukih veza, smanjuje se energetska razlika HOMO-LUMO pa tako eten ima apsorpcijski maksimum na 185 nm, a butadien na 215 nm. Kako raste broj konjugiranih dvostrukih veza u molekuli, valna duljina apsorpcijskog maksimuma pomiče se iz UV u vidljivi dio spektra elektromagnetskog zračenja, pa tako 11-*cis*-retinal apsorbira zračenje u vidljivom dijelu spektra.⁷ Osim toga, elektrostatske

i hidrofobne interakcije te vodikove veze u blizini 11-*cis*-retinala u proteinskoj okolini također utječu na položaj apsorpcijskog maksimuma. Naizgled male promjene, kao što je (de)protonacija, u proteinskoj okolini mogu imati vrlo velik utjecaj na valnu duljinu apsorpcijskog maksimuma. Protonacija Schiffove baze pretvara šest lokaliziranih dvostrukih veza u jako polarizabilan π sustav, čime se znatno mijenja valna duljina apsorpcijskog maksimuma. Povećanje broja konjugiranih dvostrukih veza u svrhu smanjenja energetske razlike HOMO-LUMO nije unikatno rješenje kod 11-*cis*-retinala. Zanimljivo je da i kod biljnih pigmenta kao što su klorofil i β -karoten, kojima je također uloga apsorpcija elektromagnetskog zračenja, postoji velik broj konjugiranih dvostrukih veza. Opisana reakcija fotoizomerizacije 11-*cis*-retinala zapravo je jedina kemijska reakcija u procesu vida koja direktno uključuje elektromagnetsko zračenje. Nakon nastanka *trans*-retinala slijedi niz biokemijskih reakcija koje nastavljaju prijenos vizualnog signala.

Danas, razvojem moćnih računala i teorijskih modela, moguće je proučavati stabilnost, energiju i svojstva različitih izomera retinala vezanih na opsin. Pogodne metode za takvu problematiku su QM/MM (kvantno mehaničke / molekularno mehaničke) višeslojne metode koje dio proteina ključan za promatranu reakciju, u ovom slučaju retinal, modeliraju koristeći kvantnu mehaniku, a ostatak proteina koristeći molekularnu mehaniku. Ovakav pristup je nužan jer se svojstva retinala mijenjaju u veznom mjestu proteina pa zasebno promatranje molekule retinala ne može pružiti korisne informacije kako se proces izomerizacije odvija *in vivo*. Promatrajući kromofore zasebno, bez proteina, 9-*cis*-retinal i 13-*cis*-retinal energetski su stabilniji od 11-*cis*-retinala. Izračunato je da proteinski kompleksi s 11-*cis*-retinalom imaju najnižu energiju, a energija proteina s vezanim 9-*cis*-retinalom je tek malo viša ($0,8\text{--}2,1 \text{ kcal mol}^{-1}$). Da bi se postigle točnije izračunate vrijednosti, potrebno je koristiti pristup elektrostatske ugradnje (EE, engl. *electrostatic embedding*) za računanje energije sustava. U tom pristupu elektrostatske interakcije uključuju se u Hamiltonian, operator ukupne energije kvantno mehaničkog sustava pa se kvantno mehanički račun provodi u prisutnosti diskretnih naboja MM područja. U EE pristupu, može se uključiti i član odgovoran za vezne interakcije između QM i MM područja. Jednostavniji pristup je mehanička ugradnja (ME, engl. *mechanical embedding*) u kojem MM okolina služi samo za deformaciju QM područja, a između njih djeluju samo Van der Waalove interakcije. Iako je ME pristup jednostavniji i brži, manje je točan te izračuni dobiveni tim pristupom pokazuju da najnižu energiju ima opsin s vezanim 9-*cis*-retinalom, što u stvarnosti nije slučaj. Teorijskim izračunima koristeći QM/MM

višeslojnu metodu pokazano je da je 11-*cis*-retinal preferiran stereozimer retinala u štapićima zbog elektrostatskih interakcija kromofora i proteina.⁸

2.2. Rodopsin

2.2.1. Receptori spregnuti s G-proteinom

Rodopsin pripada skupini receptora spregnutih s G-proteinom (engl. *G protein-coupled receptors*, GPCR). Za tu skupinu receptora karakteristično je postojanje sedam transmembranskih zavojnica pa su poznati i pod nazivom serpentinski receptori. Elektronska kriomikroskopija kristala goveđeg rodopsina omogućila je prvu vizualizaciju sedam transmembranskih zavojnica, što je uvelike doprinijelo rješavanju strukture rodopsina, kao i strukture drugih vrsta receptora spregnutih s G-proteinom.

Receptori spregnuti s G-proteinom sudjeluju u staničnom prijenosu vizualnog, mirisnog i okusnog signala, ali i prijenosu informacija izvanstaničnih glasnika kao što su hormoni i neurotransmiteri u stanici. Primarni glasnik je molekula koja se veže na receptor u međustaničnom prostoru. Primarni glasnik može biti neki hormon (npr. epinefrin) ili u ovom slučaju je to foton. Iako se foton ne “veže” na receptor, vezanju liganda i apsorpciji fotona zajedničko je da uzrokuju promjenu geometrije receptora, a ta promjena utječe i na citoplazmatski dio receptora. Promjena u citoplazmatskom dijelu omogućava zamjenu GDP-a GTP-om na G-proteinu. G-proteini koji sudjeluju u prijenosu signala mogu biti monomerni ili heterotrimerni proteini. Podjedinice heterotrimernog G-proteina označavaju se s α , β , γ . Zamjena vezanog GDP-a GTP-om na α podjedinici, dovodi do disocijacije α podjedinice od $\beta\gamma$ heterodimera. Disocirana α podjedinica veže se na neki treći protein (npr. adenilat ciklazu), u ovom slučaju cGMP-fosfodiesterazu te ga aktivira. Aktivacija tog trećeg proteina (enzima), uzrokuje porast ili pad koncentracije neke molekule u citoplazmi, koja se naziva sekundarni glasnik. Sekundarni glasnik može biti neki ciklički nukleozid monofosfat (npr. cAMP) ili neki ion, u ovom slučaju su to: cGMP i Ca^{2+} -ion. Promjena koncentracije sekundarnog glasnika može aktivirati ili inhibirati neki enzim, ali može i otvoriti / zatvoriti neki ionski kanal, što dovodi do daljnjih kemijskih promjena i odgovora na signal koji je stanica primila izvana. Ovakav signalni put omogućava reakciju stanice na neki izvanstanični podražaj bez da je ta signalna molekula (primarni glasnik) uopće ušla u stanicu. Bitno je da se prijenos signala u stanici zaustavi kad stanica prestane primati podražaj izvana. Zbog toga G-proteini posjeduju

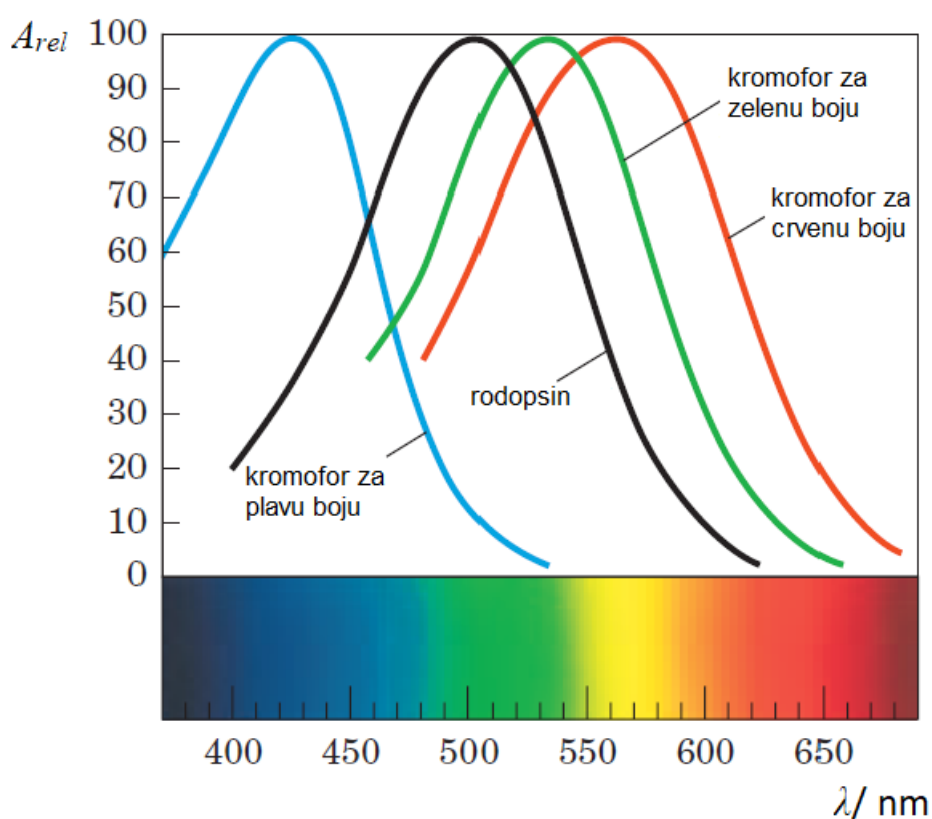
vlastitu GTP-aznu aktivnost, hidroliziraju vezani GTP do nastanka GDP-a te se na taj način sami deaktiviraju, čime prestaje aktivacija sljedećeg enzima u enzimskoj kaskadi i prestaje prijenos signala u stanici. Još jedan vrlo važan efekt koji se postiže prijenosom signala putem GCPR-a je pojačanje primarnog signala. Tako na primjer jedna molekula rodopsina koja je apsorbirala elektromagnetsko zračenje neće aktivirati samo jednu molekulu G-proteina, već će aktivirati stotinjak molekula G-proteina. Aktivirana G_{α} -GTP podjedinica aktivira sljedeći enzim u enzimskoj kaskadi, u ovom signalnom putu to je cGMP-fosfodiesteraza koja može u jednoj sekundi prevesti tisuće molekula supstrata u proudukt, što ima velik utjecaj na koncentraciju sekundarnog glasnika u stanici. Na taj način, pojačavanjem primarnog signala, vrlo mala količina primarnog glasnika može uzrokovati snažan odgovor unutar stanice, čime se postiže vrlo visoka osjetljivost na određeni podražaj.⁹

2.2.2. Struktura i funkcija rodopsina

Rodopsin je protein koji se sastoji od proteinskog dijela zvanog opsin i prostetičke skupine 11-*cis*-retinala, kovalentno vezane na amino skupinu bočnog ogranka Lys296 stvarajući protoniranu Schiffovu bazu. Nalazi se u membranama diskova u fotosenzitivnim stanicama, štapićima. Rodopsin pripada skupini receptora spregnutih s heterotrimernim G-proteinom, a G-protein kojeg aktivira rodopsin zove se transducin (G_t ili T). Na primjeru rodopsina vidljivo je međusobno nadopunjavanje apoproteina (dio proteina bez prostetičke skupine) i prostetičke skupine (neproteinski dio čvrsto, čak i kovalentno vezan na proteinski dio), u svrhu ostvarivanja željene funkcije. 11-*cis*-Retinal omogućava korištenje energije elektromagnetskog zračenja za promjenu konformacije opsina, što dovodi do aktivacije transducina i nastavka prijenosa svjetlosnog signala. Valna duljina apsorpcijskog maksimuma 11-*cis*-retinala koji s opsinom tvori protoniranu Schiffovu bazu razlikuje se od valne duljine apsorpcijskog maksimuma 11-*cis*-retinala u protoniranoj Schiffovoj bazi u otopini. Protonirana Schiffova baza 11-*cis*-retinala u otopini ima apsorpcijski maksimum oko 440 nm dok u rodopsinu ima oko 500 nm.⁹

Druga vrsta fotoreceptorskih stanica su čunjići. Čunjići omogućavaju razlikovanje boja. Prijenos signala je zapravo isti kao i u slučaju rodopsina, ali se razlikuju proteini na koje je vezan 11-*cis*-retinal. Postoje tri tipa čunjića koji mogu detektirati svjetlo različitih valnih duljina. Tri vrste čunjića imaju apsorpcijske maksimume pri valnim duljinama: 420 nm, 530 nm i 560 nm, što odgovara detekciji plave, zelene i crvene boje (vidljivo na slici 5).

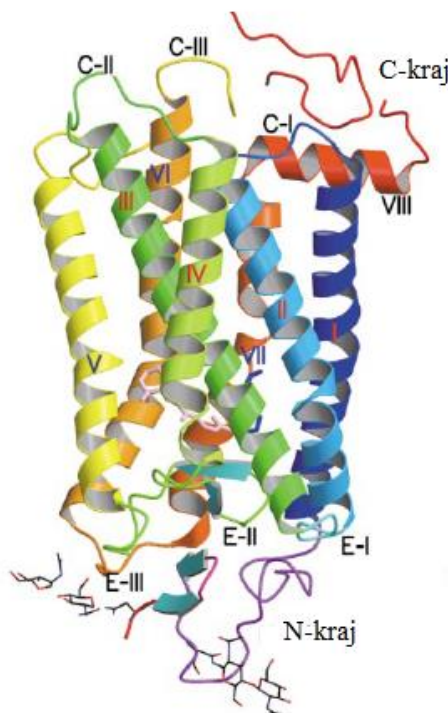
Detekcija svjetla različitih valnih duljina postiže se različitim proteinskim okruženjem kromofora, čime se mijenja valna duljina apsorpcijskog maksimuma. Kombinacijom različitih intenziteta signala dobivenih iz različitih vrsta čunjića omogućeno je razlikovanje boja. Mutacije različitih vrsta opsina mogu dovesti do neosjetljivosti na crvenu, zelenu ili plavu boju, ali i do promjene valne duljine apsorpcijskog maksimuma, što rezultira nemogućnošću raspoznavanja boja, poremećaja poznatog kao daltonizam.²



Slika 5. Apsorpcijski spektar rodopsina te plavog, zelenog i crvenog kromofora različitih vrsta čunjića. Vidljivo je da kromofori za plavu, zelenu i crvenu boju imaju apsorpcijske maksimume pri 420 nm, 530 nm i 560 nm, a 11-*cis*-retinal u rodopsinu 500 nm.²

Postoji još jedna važna posljedica međusobne interakcije proteinskog dijela i prostetičke skupine, a to je kontrola aktivnosti. Rodopsin nakon izomerizacije 11-*cis*-retinala ne dolazi odmah u aktivnu formu koja se naziva metarodopsin II (s vezanim *trans*-retinalom), nego na tom putu nastaju i međuprodukti: batorodopsin, lumirodopsin, metarodopsin I i konačno metarodopsin II. Nastajanje aktivnog metarodopsina II iz rodopsina s vezanim 11-*cis*-retinalom događa se na milisekundnoj skali. Vrlo je važno da rodopsin ne aktivira transducin kad nema

vanjskog podražaja. Opsin bez vezanog 11-*cis*-retinala je stotinjak puta manje aktivan od aktivnog stanja metarodopsina II. Međutim, opsin s vezanim 11-*cis*-retinalom je još manje aktivan, što znači da 11-*cis*-retinal djeluje kao antagonist, sprječavajući aktivaciju transducina kad nema vanjskog svjetlosnog podražaja.

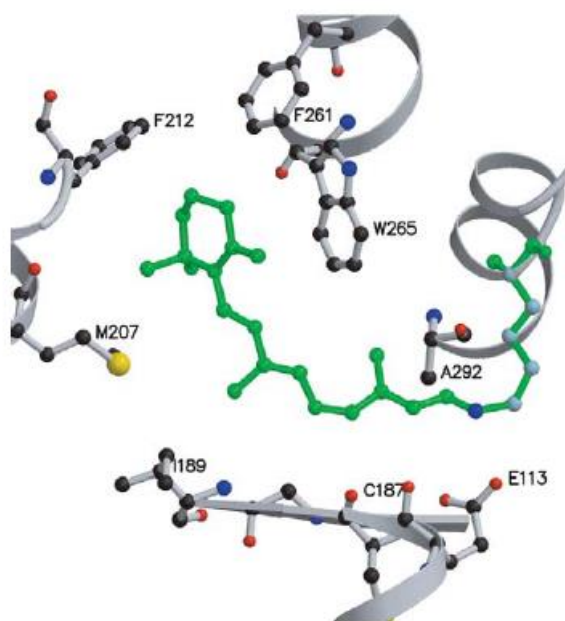


Slika 6. Sedam transmembranskih zavojnica opsina, označene brojevima I–VII. Na slici su vidljive citoplazmatske domene označene s C-I, C-II, C-III te domene koje se nalaze unutar diska E-I, E-II, E-III kao i C-kraj proteina koji se nalazi u citoplazmatskom dijelu te N-kraj proteina koji se nalazi unutar diska.⁹

Bočni ogranak aminokiseline lizina koji s 11-*cis*-retinalom stvara Schiffovu bazu, nalazi se u sredini zavojnice broj VII. Protonirana Schiffova baza stvara solni most s Glu133 u zavojnici broj III opsina. Zavojnice su vidljive na slici 6. Elektrostatske interakcije u unutrašnjosti proteina su jače nego u vodenoj otopini jer je u unutrašnjosti proteina manja dielektrična konstanta od dielektrične konstante vode. Zbog toga, privlačne elektrostatske interakcije u unutrašnjosti proteina mogu značajno stabilizirati određenu strukturu proteina, ali odbojne elektrostatske interakcije ili postojanje nabijenog bočnog ogranka koji nema odgovarajući protuion mogu značajno destabilizirati odgovarajuću strukturu proteina. Elektrostatske interakcije protonirane Schiffove baze s bočnim ogrankom Glu133, nekoliko mreža vodikovih

veza koje uključuju i molekule vode blizu 11-*cis*-retinala, te hidrofobne interakcije, uzrok su pomaka apsorpcijskog maksimuma 11-*cis*-retinala prema većim valnim duljinama u proteinskoj okolini, ali i njegovog antagonističkog djelovanja.

11-*cis*-Retinal gotovo je planarna molekula. Međutim, u proteinu je dvostruka C11-C12 veza iskrivljena (diedarski kut iznosi -18°), a također i jednostruka C6-C7 veza (diedarski kut iznosi oko -77°) koja određuje orijentaciju β -iononskog prstena (prsten u retinalu, vidljiv na slici 2). Interakcija dvostruke C11-C12 veze sa zavojnicom broj II unutar diska i interakcija metilne skupine na C13 atomu s Trp265 uzrokuju torziju C11-C12 dvostruke veze. Orijentacija β -iononskog prstena određena je hidrofobnim interakcijama s Phe212, Phe261 i Trp265. Zbog navedenih razloga, kromofor ima rigidnu, iskrivljenu strukturu (slika 7), koja uzrokuje promjenu apsorpcijskog maksimuma te značajno povećava kvantno iskorištenje fotoreakcije, čime se postiže vrlo visoka osjetljivost receptora te je stvoren preduvjet za detekciju, i daljni prijenos vizualnog signala. U zavojnici broj III nalazi se vezno mjesto za C-kraj α podjedinice transducina pa je to ključni dio za aktivaciju transducina. Za postojanje protonirane Schiffove baze, važnu ulogu ima Thr94 koji stvara vodikovu vezu s Glu133 i na taj način orijentira bočni ogranak glutamata te osigurava veću stabilizaciju Schiffove baze. Osim Thr94 važna je i molekula vode koja zajedno s Thr94 stvara vodikovu vezu s karboksilnom skupinom glutamata. Nakon fotoizomerizacije 11-*cis*-retinala u *trans*-retinal mijenja se i orijentacija β -iononskog prstena, što znatno utječe na stvaranje aktivnog metarodopsina II i aktivaciju transducina. Tijekom fotoizomerizacije kromofora, proton s protonirane Schiffove baze prelazi na Glu133, narušavaju se još neke elektrostatske interakcije, vodikove veze i hidrofobne interakcije te dolazi do promjene konformacije proteina, odnosno do nastajanja aktivnog metarodopsina II koji zatim aktivira transducin. Sustav u kojem su deprotonirani Glu133 i Schiffova baza, energetski je viši za 86 kcal mol^{-1} od sustava u kojem postoji separacija naboja. Deprotonirana Schiffova baza u metarodopsinu II uzrok je pomaka apsorpcijskog maksimuma s 500 nm na 380 nm, čime se gubi moć apsorpcije zračenja u vidljivom dijelu spektra pa se ta vrsta naziva i izbijeljeni rodopsin.^{4,5,9,10}



Slika 7. 11-*cis*-Retinal u proteinskom okruženju rodopsina ima rigidnu strukturu. Inače planarna molekula 11-*cis*-retinala, u proteinskom okruženju u rodopsinu ima iskrivljenu strukturu, što utječe na svojstva bitna u detekciji i prijenosu svjetlosnog signala (kvantno iskorištenje i valnu duljinu apsorpcijskog maksimuma).⁵

2.2.3. Desenzitizacija rodopsina

Kao što je bitno prenijeti neki signal izvana u stanicu, isto tako je bitno da stanje u stanici tijekom prijenosa signala bude strogo kontrolirano. Da ne bi došlo do prekomjerne aktivacije G-proteina od strane GPCR-a, dolazi do desenzitizacije. To vrijedi općenito za receptore spregnute s G-proteinom, pa tako i za rodopsin. Pri brzim promjenama izloženosti različitim svjetlosnim signalima, potrebna je brza prilagodba receptora na promijenjene uvjete kako mozak ne bi primao zaostali signal koji više ne postoji. Najčešće dolazi do fosforilacije receptora, koju katalizira neka protein kinaza iz familije GPCR kinaza, takozvana G receptor kinaza (GRK). Aktivnost GRK-a regulirana je promjenom koncentracije neke tvari u stanici do koje dolazi uslijed prijenosa signala detektiranog GPCR-om. Fosforilacija receptora uzrokuje konformacijsku promjenu receptora i omogućava vezanje jednog proteina iz familije arrestina, koji onemogućavaju interakciju receptora i G-proteina pa samim time i daljnju aktivaciju G-proteina.¹¹

Kod rodopsina, jedna od glavnih mjesta fosforilacije su Ser338, Ser343 i Thr336, bočni ogranci u blizini C-kraja proteina. Kad nastane metarodopsin II, veže enzim, rodopsin kinazu (GRK1) koja fosforilira receptor na serinskim i treoninskim bočnim ograncima. Uglavnom se fosforilira nekoliko bočnih ogranaka metarodopsina II, a preferentni donator fosforilne skupine je ATP.¹² Maksimalan broj aminokiselinskih ostataka u rodopsinu koji mogu biti fosforilirani je 9. Potrebna je fosforilacija nekoliko aminokiselinskih ostataka za brzo smanjenje aktivnosti rodopsina. Rodopsin kinaza je funkcionalno i strukturno homologna β -adrenergičkoj kinazi (β ARK) koja sudjeluje u desenzitizaciji β -adrenergičkog receptora, također receptora spregnutog s G-proteinom. Proces fosforilacije rodopsina ovisan je o koncentraciji Ca^{2+} -iona, koja se mijenja uslijed apsorpcije elektromagnetskog zračenja i prijenosa vizualnog signala. U fosforilaciji rodopsina sudjeluje protein čija aktivnost ovisi o koncentraciji Ca^{2+} -iona. Taj protein zove se rekoverin. U uvjetima visoke koncentracije Ca^{2+} -iona, rekoverin je vezan na GRK1 te inhibira njegovu aktivnost. Rekoverin se specifično veže na kinazu tipa GRK1, ali se ne veže na druge tipove kinaza receptora spregnutih s G-proteinom (npr. β ARK). Aktivirani rodopsin aktivira transducin, koji zatim aktivira cGMP-fosfodiesterazu, što dovodi do smanjenja koncentracije cGMP-a i zatvaranja ionskih kanala za Ca^{2+} -ione. Kad se koncentracija Ca^{2+} -iona u stanici smanji zbog navedenog razloga, rekoverin disocira s GRK1-a, čime GRK1 postaje aktivan i fosforilira rodopsin te na taj način onemogućava daljnju aktivaciju transducina.^{13,14}

2.3. Transducin

Transducin je protein koji sudjeluje u prijenosu vizualnog signala, povezujući prijenos informacije od rodopsina do cGMP-fosfodiesteraze, te pripada skupini heterotrimernih G-proteina. To je periferni protein koji je vezan na membranu diska s citoplazmatske strane i ima tri podjedinice α , β , γ . Bez vanjskog podražaja, u mraku, kad je na rodopsin vezan 11-*cis*-retinal, nema aktivacije transducina i na α podjedinicu je vezan GDP. Fotoizomerizacija 11-*cis*-retinala u *trans*-retinal uzrokuje promjenu geometrije rodopsina, nastaje metarodopsin II te dolazi do zamjene GDP-a GTP-om na α podjedinici transducina, čime G-protein postaje aktivan. G_{α} -GTP disocira s $\beta\gamma$ heterodimera i aktivira sljedeći enzim, cGMP fosfodiesterazu koja hidrolizira cGMP do GMP-a, što utječe na otvorenost ionskih kanala za ione Na^{+} i Ca^{2+} u plazmatskoj membrani. T_{α} ima intrinzičnu GTP-aznu aktivnost, hidrolizira GTP nakon prestanka svjetlosnog podražaja, pri čemu nastaje GDP i dolazi do ponovne asocijacije s $\beta\gamma$ podjedinicama. Budući da je rodopsin receptor u membranama diskova u štapićima, opis interakcija rodopsin-transducin, kao i daljnji opis transducina, odnosi se na štapiće. G-proteini u štapićima i čunjićima nisu identični.

Rodopsin u citoplazmatskom dijelu ima tri petlje (slika 6), ali u blizini C-kraja proteina, dva bočna ogranka susjednih cisteina imaju kovalentno vezane palmitinske kiseline kojima se usidruju u membranu i stvara se četvrta petlja. Petlje 2, 3 i 4 su odgovorne za vezanje transducina. Metarodopsin I i aktivna forma metarodopsin II su tautomeri. Deprotonacijom Schiffove baze koju tvore *trans*-retinal i opsin nastaje metarodopsin II. Uslijed izomerizacije i deprotonacije Schiffove baze dolazi do pomicanja apsorpcijskog maksimuma s 500 nm na 380 nm te do konformacijske promjene proteinskog dijela koja je ključna za aktivaciju transducina.

Zbog svoje funkcije, α podjedinica mora moći interreagirati s $\beta\gamma$ podjedinicama, receptorom (rodopsinom) i cGMP-fosfodiesterazom. T_{α} na glicinu u blizini N-kraja ima vezanu miristinsku kiselinu, što je važno za veliki afinitet prema $\beta\gamma$ podjedinicama, ali i za interakcije s membranom. Za interakciju α i $\beta\gamma$ podjedinica bitna je posttranslacijska farnezilacija γ podjedinice, a za interakciju s rodopsinom, ključnu ulogu ima C-kraj α podjedinice.¹⁵ Nakon aktivacije transducina rodopsinom, aktivna T_{α} -GTP podjedinica aktivira cGMP-fosfodiesterazu koja direktno mijenja koncentraciju sekundarnog glasnika cGMP-a hidrolizom tog spoja. Koncentracija cGMP-a utječe na otvorenost određenih ionskih kanala pa se na taj način mijenja i koncentracija Ca^{2+} -iona koji su također sekundarni glasnici.

2.4. cGMP-fosfodiesteraza

cGMP-fosfodiesteraza (PDE) je kao i transducin, periferni protein vezan na membranu diska s citoplazmatske strane u štapićima. Transducin, točnije aktivirana α podjedinica transducina, s vezanim GTP-om aktivira cGMP-fosfodiesterazu koja hidrolizira cGMP do GMP-a. cGMP je sekundarni glasnik koji kontrolira otvorenost kanala za ione Na^+ i Ca^{2+} . Kad uslijed apsorpcije elektromagnetskog zračenja transducin aktivira PDE, dolazi do hidrolize cGMP-a, što uzrokuje zatvaranje ionskih kanala za ione Na^+ i Ca^{2+} te dolazi do hiperpolarizacije membrane. PDE uz rodopsin znatno doprinosi pojačanju vizualnog signala u stanici. Aktivna forma rodopsina, metarodopsin II može aktivirati najmanje 500 molekula transducina, a svaka molekula transducina po jednu molekulu PDE. PDE doprinosi znatnom pojačanju signala zbog svojeg izuzetno velikog okretnog broja. Svaka aktivirana molekula PDE u jednoj sekundi može hidrolizirati 4200 molekula cGMP-a.

Vezanje cGMP-a na ionske kanale je kooperativno. Kooperativno vezanje znači da se na protein koji ima više veznih mjesta za isti ligand ne vežu svi ligandi jednakim afinitetom. Prva molekula će se najteže vezati, ali ona izaziva konformacijsku promjenu proteina, što mijenja afinitet za vezanje druge molekule, itd. Zbog pozitivnog kooperativnog vezanja cGMP-a, mala promjena u koncentraciji cGMP-a može značajno utjecati na otvorenost kanala pa samim time i na membranski potencijal. Apsorpcija jednog fotona, može zatvoriti 1000 ionskih kanala i promijeniti membranski potencijal za 1 mV.^{2,16}

PDE je tetramerni protein koji se sastoji od α, β i dvije γ podjedinice. Podjedinice α i β katalitički su aktivne, a dvije γ podjedinice su inhibitorne. U inaktivnom obliku, γ podjedinice vezane su na $\alpha\beta$ katalitički dimer i na taj način inhibiraju aktivnost enzima. Vezanjem T_α -GTP na γ podjedinicu transducina, narušavaju se interakcije γ i $\alpha\beta$ podjedinica te enzim postaje katalitički aktivan. PDE se aktivira tako što se jedna inhibitorna podjedinica pomiče više od druge oslobađajući jedno aktivno mjesto u potpunosti. Ako je koncentracija cGMP-a visoka, obje inhibitorne podjedinice ostaju vezane na dimer, ali se jedno aktivno mjesto u potpunosti oslobađa, dok pri nižoj koncentraciji cGMP-a jedna podjedinica disocira sa dimera. Vezne interakcije druge inhibitorne podjedinice i $\alpha\beta$ dimera neznatno slabe, stoga je katalitička aktivnost druge podjedinice puno manja.¹⁷

2.5. Hiperpolarizacija

2.5.1. Prijenos tvari preko membrane

Za stanicu je od životne važnosti moći prenijeti razne korisne tvari iz okoline u stanicu, ali i različite metaboličke nusprodukte iznijeti iz stanice u okolinu. Stanična membrana građena je od fosfolipidnog dvosloja, polarne hidrofilne glave okrenute su prema citosolu i međustaničnom prostoru, a hidrofobni lipidni repovi okrenuti su jedan prema drugom. Budući da je stanična membrana tako građena, nepolarne molekule mogu proći kroz staničnu membranu, ali većina polarnih i nabijene molekule ne mogu. Ioni i polarne tvari u vodi su hidratizirani. Da bi neka tvar iz vode mogla prijeći kroz lipidni dvosloj, elektrostatske interakcije i vodikove veze koje se stvaraju između vode i otopljene tvari moraju biti kompenzirane interakcijama otopljene tvari i lipida, što nije moguće. Da bi prijenos iona i polarnih tvari kroz membranu ipak bio moguć, postoje različiti proteinski kanali i prenositelji koji to omogućavaju.

S termodinamičkog gledišta, kretanje tvari u smjeru koncentracijskog gradijenta (iz područja više koncentracije u područje niže koncentracije) je egzergon i spontani proces. Iako je proces termodinamički povoljan, ne znači nužno da će se on dogoditi dovoljno brzo. Kao i u bilo kojem kemijskom procesu, bitno je u obzir uzeti dva aspekta nekog kemijskog procesa: termodinamički i kinetički. Proces prijenosa otopljene tvari u stanicu može biti termodinamički povoljan, ali kinetički jako spor jer je prevelika energija aktivacije za prijenos te tvari kroz lipidni dvosloj. Da bi se kinetički ubrzao povoljni termodinamički proces, postoje proteini koji olakšavaju i ubrzavaju proces prijenosa tvari u stanicu. Proteinski potpomognut prijenos tvari preko stanične membrane u smjeru gradijenta zove se olakšana difuzija.

U termodinamički povoljnom prijenosu otopljenih tvari između stanice i okoline, mogu sudjelovati prenositelji i kanali. Prenositelji pokazuju veću stereospecifičnost prema supstratu te postoji efekt zasićenja, što znači da postoji maksimalna brzina prijenosa koja se postiže kad su sva vezna mjesta prenositelja popunjena. Brzina prijenosa prenositeljem je znatno manja od prijenosa kanalima. Kanali pokazuju manju stereospecifičnost, ne postoji efekt zasićenja, a brzina prijenosa može biti reda veličine slobodne difuzije, pa čak i veća. U prijenosu iona mogu sudjelovati i ionofori, nepolarne organske molekule koje vežu ion, „maskiraju“ njegov naboj i omogućavaju prijenos kroz lipidni dvosloj.

Osim termodinamički povoljnog prijenosa, u stanici se događa i prijenos tvari koji nije termodinamički povoljan. Proces koji ima pozitivnu promjenu Gibbsove energije zove se

endergoni proces. Proteinski potpomognut prijenos tvari preko stanične membrane koji je termodinamički nepovoljan, zove se aktivni transport. Endergoni prijenos tvari potrebno je spregnuti s nekim egzergonim procesom. Energija za endergoni prijenos može se osigurati iz tri izvora. Prvi izvor je direktna hidroliza ATP-a, gdje se dobivena energija može iskoristiti za prijenos tvari u smjeru suprotnom od (elektro)kemijskog gradijenta. Drugi izvor energije za endergoni proces može biti sprezanje endergonog prijenosa neke tvari s prijenosom neke druge tvari, koji je egzergon, čime se postiže ukupna egzergonost procesa. Kotransporter koji mogu prenositi dvije različite vrste u suprotnim smjerovima zovu se antiporter. Antiporter koriste navedeni drugi izvor energije. Svjetlosna energija je treći izvor energije koji mogu koristiti ionske pumpe za prijenos tvari u smjeru suprotnom od (elektro)kemijskog gradijenta, što je slučaj kod bakteriorodopsina. Ionske pumpe su vrlo važne u procesu prijenosa živčanog signala, ali i u drugim biološki važnim procesima kao što je sinteza ATP-a, u kojem se energija dobivena oksidacijom reduciranih kofaktora iz metaboličkih procesa koristi za pumpanje protona iz matriksa mitohondrija u citoplazmu.

Ako je membrana potpuno nepropusna za ione, postoji transmembranski potencijal. U slučaju postojanja transmembranskog potencijala za prijenos nabijenih tvari preko membrane nije dovoljno u obzir uzeti samo koncentracijski gradijent, nego treba u obzir uzeti elektrokemijski gradijent. Osim kretanja otopljene tvari u smjeru koncentracijskog gradijenta ili smjeru suprotnom od koncentracijskog gradijenta, važno je hoće li taj prijenos smanjiti ili povećati membranski potencijal. Prijenos električki nabijene tvari u smjeru koji smanjuje membranski potencijal doprinosi smanjenju Gibbsove energije prijenosa i čini taj prijenos energetski povoljnijim. Nabijene vrste spontano će se kretati u smjeru elektrokemijskog gradijenta.²

2.5.2. Na^+/K^+ -ATP-aza

Na^+/K^+ -ATP-aza poznata i kao Na^+/K^+ pumpa vrsta je aktivnog prenositelja koji koristi energiju ATP-a za stvaranje elektrokemijskog gradijenta iona Na^+ i K^+ te pripada skupini ATP-aza P tipa. Pumpanje različitih iona u stanicu ili izvan nje dovodi do polarizacije plazmatske membrane i stvaranja transmembranskog potencijala, što je bitno u prijenosu živčanog signala. Ovaj prenositelj u principu postoji samo kod životinja, iako su homologni proteini nađeni u arhejama i algama. Svi proteini koji pripadaju skupini ATP-aza P tipa slične su građe, citoplazmatske domene povezane su na transmembransku regiju. Tri citoplazmatske domene su: fosforilacijska (P, engl. *phosphorylation*), domena koja veže nukleotid

(N, engl. *nucleotide-binding*) i pokretačka (A, engl. *actuator*). Sve vrste ATP-aza P tipa imaju Asp u P domeni, koji se fosforilira i to je ključno za funkciju ATP-aza P tipa. Čak imaju i vrlo sličan aminokiselinski sastav, naročito u blizini navedenog aspartata. U N domeni dolazi do vezanja nukleotida, ATP-a koji se koristi za fosforilaciju prenositelja, a fosforilacija se događa na bočnom ogranku aspartata koji se nalazi u P domeni. Zanimljivo je da ATP-aze P tipa imaju autofosforilacijsku i autofosfataznu aktivnost, što znači da im nisu potrebne zasebne protein kinaza i protein fosfataza za fosforilaciju i defosforilaciju.

(De)fosforilacija prenositelja mijenja njegovu konformaciju, što utječe na orijentaciju prenositelja, ali i na afinitet vezanja supstrata. Po jednoj molekuli ATP-a, Na^+/K^+ -ATP-aza prenese tri Na^+ -iona iz citoplazme u međustanični prostor i dva K^+ -iona iz međustaničnog prostora u citoplazmu. Transmembranski potencijal koji nastaje djelovanjem ovog prenositelja iznosi od -50 mV do -70 mV (citoplazma je negativno nabijena u odnosu na međustanični prostor), ali djelovanjem drugih ionskih pumpi i kanala može doći do promjene membranskog potencijala, što je u suštini ključno za prijenos živčanog signala. Defosforilirana Na^+/K^+ -ATP-aza nalazi se u E1 konformaciji u kojoj je vezno mjesto okrenuto prema citoplazmatskoj strani i ima veliki afinitet prema Na^+ -ionima, a mali prema K^+ -ionima. U konformaciji E1, enzim veže tri Na^+ -iona u citoplazmi te dolazi do fosforilacije. Fosforilacija preferira E2P konformaciju u kojoj je vezno mjesto okrenuto prema međustaničnom prostoru te ima mali afinitet za Na^+ -ione, a veliki afinitet za K^+ -ione. Fosforilirani prenositelj ispušta tri Na^+ -iona vezana u citoplazmatskom dijelu u međumembranski prostor. Zatim, prenositelj veže dva K^+ -iona u međustaničnom prostoru, dolazi do defosforilacije, promjene orijentacije i afiniteta prenositelja prema K^+ -ionima, te se dva K^+ -iona otpuštaju u citoplazmu. Važnost Na^+/K^+ -ATP-aze vidljiva je iz činjenice da taj prenositelj kod ljudi troši 25% ukupne količine ATP-a u tijelu za vrijeme mirovanja.^{2,18}

2.5.3. Ca^{2+} – sekundarni glasnik

Ca^{2+} -ion je uz cGMP drugi sekundarni glasnik u procesu prijenosa vizualnog signala. Na koncentraciju Ca^{2+} -iona u citoplazmi vanjskog dijela štapića utječe nekoliko ionskih kanala i prenositelja. U mraku, bez svjetlosnog podražaja, relativno visoke koncentracije cGMP-a održavaju ionske kanale za Ca^{2+} -ione otvorenima. U takvim uvjetima koncentracija Ca^{2+} -iona u citoplazmi iznosi 500 nmol dm^{-3} . Zatvaranjem ionskih kanala za ione Na^+ i Ca^{2+} , reguliranih koncentracijom cGMP-a, dolazi do hiperpolarizacije plazmatske membrane. Smanjenje

koncentracije Ca^{2+} -iona uzrokuje aktivaciju gvanilat ciklaze koja katalizira nastajanje cGMP-a iz GTP-a, ali uzrokuje i inhibiciju PDE. Regulacijom koncentracije cGMP-a, Ca^{2+} -ioni imaju ključnu ulogu u adaptaciji i regeneraciji.²

U mraku, bez vizualnog podražaja, ravnotežna koncentracija Ca^{2+} -iona u vanjskom dijelu štapića postiže se djelovanjem ionskih kanala za Ca^{2+} -ione i $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}\text{--K}^+$ izmjenjivačem. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}\text{--K}^+$ izmjenjivač je antiporter koji prebacuje Ca^{2+} -ione iz citoplazme u međumembranski prostor. Prvo se smatralo da taj prijenos uključuje samo ione Na^+ i Ca^{2+} , ali kasnije je otkriveno da u prijenosu sudjeluju i K^+ -ioni. Stehiometrija tog prijenosa iznosi $4\text{Na}^+:\text{Ca}^{2+}:\text{K}^+$. Za svaka 4 Na^+ -iona koja uđu u citoplazmu, jedan K^+ -ion i jedan Ca^{2+} -ion prenesu se iz citoplazme. Za prijenos Ca^{2+} -iona u smjeru suprotnom od elektrokemijskog gradijenta koristi se energija prijenosa iona Na^+ i K^+ , koji se kreću u smjeru elektrokemijskog gradijenta. Da bi prijenos Ca^{2+} -iona na ovaj način bio moguć, Na^+/K^+ pumpa mora konstantno prenositi Na^+ -ione izvan stanice i K^+ -ione u stanicu. Bez podražaja, koncentracija cGMP-a je dovoljna da održava kanale za ione Na^+ i Ca^{2+} otvorenima. Djelovanjem $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}\text{--K}^+$ izmjenjivača i ionskih kanala za ione Na^+ i Ca^{2+} , postiže se ravnotežni membranski potencijal, a sprječava se hiperpolarizacija.¹⁹

Uslijed prijenosa vizualnog signala, smanjuje se koncentracija cGMP-a te se ionski kanali za ione Na^+ i Ca^{2+} zatvaraju. Iako se navedeni ionski kanali zatvaraju, Na^+/K^+ pumpa i $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}\text{--K}^+$ izmjenjivač nastavljaju djelovati, što konačno dovodi do hiperpolarizacije. Promjena koncentracije iona Na^+ i Ca^{2+} u citoplazmi dovodi do hiperpolarizacije, ali zbog osjetljivosti gvanilat ciklaze i PDE na Ca^{2+} -ione, samo Ca^{2+} -ioni utječu na adaptaciju stanice uslijed vanjskog svjetlosnog podražaja i regeneraciju stanja u stanici nakon završetka prijenosa signala.

Ionski kanali za ione Ca^{2+} i Na^+ koji su pod utjecajem cGMP-a, Na^+/K^+ pumpa i $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}\text{--K}^+$ izmjenjivač reguliraju koncentraciju iona Ca^{2+} , Na^+ te K^+ u stanici, a time i membranski potencijal, i aktivnost gvanilat ciklaze i PDE. Isprepletenost djelovanja cGMP-a i Ca^{2+} -iona dovodi do uspješnog prijenosa vizualnog signala dalje prema mozgu, ali i regeneraciji stanja u stanici nakon što je taj signal prenesen.²⁰

2.6. Gvanilat ciklaza

Regeneracija takozvanog tamnog stanja, stanja u stanici prije detekcije vizualnog signala, zahtjeva povišenje koncentracije cGMP-a nakon što je cGMP-fosfodiesteraza hidrolizom smanjila koncentraciju cGMP-a. Ponovnu sintezu cGMP-a katalizira enzim gvanilat ciklaza, čija aktivnost ovisi o koncentraciji Ca^{2+} -iona. Koncentracija Ca^{2+} -iona i cGMP-a kontrolirana je recipročno negativnom povratnom spregom. Kad koncentracija Ca^{2+} -iona padne ispod 100 nmol dm^{-3} (prije prijenosa signala iznosi $\sim 500 \text{ nmol dm}^{-3}$), povećava se aktivnost gvanilat ciklaze. U aktivaciji gvanilat ciklaze uslijed smanjenja koncentracije Ca^{2+} -iona posreduje jedan mali topljivi protein, rekovertin. Rekovertin ima nekoliko bitnih uloga u procesu prijenosa vizualnog signala – jedna je regulacija aktivnosti gvanilat ciklaze, što utječe na koncentraciju cGMP-a u stanici, a druga je već spomenuta uloga u desenzitizaciji rodopsina. Oba ova procesa u kojima sudjeluje rekovertin vode zaustavljanju promjena u stanici koje nastaju uslijed prijenosa vizualnog signala i vraćanju stanja u stanici kakvo je bilo prije detekcije vizualnog signala.

Hillov koeficijent aktivacije gvanilat ciklaze rekovertinom je oko 3, što ukazuje na visoku kooperativnost. Hillov koeficijent je mjera kooperativnosti. Ukoliko je Hillov koeficijent veći od jedan, radi se o pozitivnoj kooperativnosti, Hillov koeficijent jednak jedan znači da nema kooperativnosti, a Hillov koeficijent manji od jedan ukazuje na negativnu kooperativnost. Vrijednost Hillovog koeficijenta može poslužiti za otkrivanje pozitivne ili negativne kooperativnosti ako kooperativnost uopće postoji. Kooperativnost je efekt koji označava nejednak afinitet vezanja liganada koji se vežu na različita vezna mjesta u istom proteinu. Ako postoji kooperativnost, vezanje liganda uzrokuje konformacijsku promjenu proteina, što utječe na afinitet vezanja sljedećeg liganda. Pozitivna kooperativnost znači da će se prva molekula najteže vezati, najslabijim afinitetom, ali da će se svaka sljedeća vezati lakše, jačim afinitetom. Negativna kooperativnost znači da će prva molekula koja se veže na protein smanjiti afinitet vezanja sljedeće molekule na istu molekulu proteina. Nepostojanje kooperativnosti jednostavno znači da vezanje liganda na protein neće utjecati na vezanje sljedeće molekule liganda na istu molekulu proteina. Ligand koji mijenja afinitet vezanja drugog liganda zove se modulator. Ako modulator povećava afinitet vezanja drugog liganda, radi se o pozitivnom modulatoru, odnosno ako smanjuje, radi se o negativnom modulatoru. Modulator može biti homotropni i heterotropni. Homotropni modulator utječe na vezanje druge molekule liganda koja je identična prvoj, dok heterotropni modulator utječe na vezanje druge

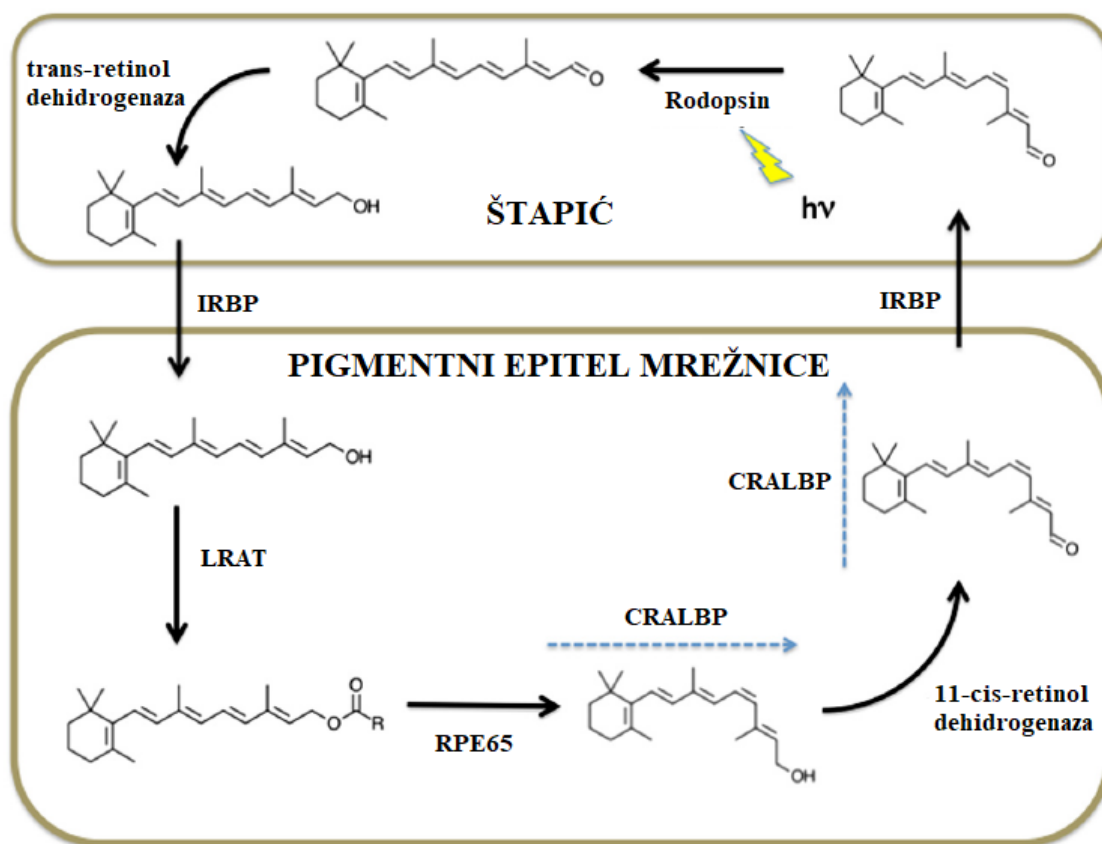
molekule koja se razlikuje od modulatora. Posljedica kooperativnosti je da relativno mala promjena koncentracije Ca^{2+} -iona u citoplazmi dovodi do značajne promjene u aktivnosti gvanilat ciklaze.²¹

2.7. Retinoidni ciklus

11-*cis*-Retinal kovalentno je vezan na proteinski dio opsin, s kojim tvori protoniranu Schiffovu bazu. Nakon apsorpcije fotona i fotoizomerizacije, dolazi do hidrolize Schiffove baze, pri čemu nastaju slobodni *trans*-retinal i apoprotein opsin. Nakon jednog ciklusa detekcije i prijenosa svjetlosnog signala, potrebno je *trans*-retinal opet prevesti u 11-*cis*-retinal i ponovno ga vezati na opsin. Ponovnim vezanjem 11-*cis*-retinala na opsin nastaje funkcionalni rodopsin, koji ponovno može sudjelovati u detekciji vizualnog signala. Regeneracija 11-*cis*-retinala iz *trans*-retinala prikazana je na slici 8.

Mrežnica je kompleksno tkivo koje se sastoji od više vrsta stanica, već navedenih fotoreceptorskih stanica, pigmentnih stanica koje tvore pigmentni epitel mrežnice, Müllerovih stanica te nekoliko dodatnih vrsta neurona (uz fotoreceptorske stanice) koji prenose živčani signal nastao djelovanjem fotoreceptorskih stanica. Većina kemijskih reakcija retinoidnog ciklusa događa se u pigmentnom epitelu mrežnice i Müllerovim stanicama, a manji broj reakcija u fotosenzibilnim neuronima. Reakcije u Müllerovim stanicama bitnije su za čunjiće, ali taj proces, za razliku od regeneracije rodopsina, nije dovoljno istražen.

Prva reakcija u procesu regeneracije je redukcija *trans*-retinala u *trans*-retinol, katalizirana s nekoliko vrsta membranski vezanih dehidrogenaza u štapićima. Novonastali *trans*-retinol prenosi se u pigmentni epitel mrežnice (PEM) pomoću interfotoreceptorskog retinol veznog proteina (IRBP). U PEM-u, *trans*-retinol veže se na lecitin retinol acil-transferazu (LRAT) pomoću staničnog retinol-veznog proteina (CRBP). *trans*-Retinilni ester nastaje u reakciji acilacije *trans*-retinola kataliziranoj LRAT-om. U sljedećem koraku enzim RPE65 hidrolizira i izomerizira *trans*-retinilni ester pri čemu nastaje 11-*cis*-retinol. *cis*-Specifična retinol dehidrogenaza (RDH5) oksidira 11-*cis*-retinol i prevodi ga u 11-*cis*-retinal, a stanični retinaldehid vezni protein (CRALBP) osigurava povoljnu mikrookolinu koja dovodi do nastajanja 11-*cis*-retinala. Konačno nastali 11-*cis*-retinal veže se na CRALBP i pomoću IRBP-a vraća u fotoreceptorske stanice te ponovnim vezanjem na opsin stvara funkcionalni rodopsin, spreman za novi krug detekcije vizualnog signala.



Slika 8. Regeneracija 11-*cis*-retinala iz *trans*-retinala u retinoidnom ciklusu koji se događa u štapićima i pigmentnom epitelu mrežnice. Na slici su prikazane strukture ključnih molekula koje sudjeluju u ciklusu.²²

Kromofor, 11-*cis*-retinal pripada skupini retinoida. Funkcionalni retinoidi u organizmu se nalaze u tri različita oksidacijska stanja: retinol (alkohol), retinal (aldehid) i retinska kiselina (karboksilna kiselina). Retionoidi u organizmu nastaju oksidativnim cijepanjem pro-vitamina A poznatog i kao β -karoten. U procesu vida sudjeluju retionidi u dva oksidacijska stanja: retinol i retinal. 11-*cis*-Retinal nije termodinamički najstabilniji *cis* izomer retinala, ali ipak gotovo isključivo nastaje upravo taj izomer. U štapićima miševa pronađeni su u zanemarivim količinama 9-*cis*-retinal i 13-*cis*-retinal. Proučavanjem pojedinih enzima (RPE65, RDH5, CRALBP, DES1) koji sudjeluju u retinoidnom ciklusu zapaženo je da nisu strogo selektivni prema nastajanju 11-*cis*-retinala. Opsin s vezanim 9-*cis*-retinalom (izorodopsin I) i 9,13-*dicis*-retinalom (izorodopsin II) također su funkcionalni, ali imaju dvostruko manje

kvantno iskorištenje od rodopsina. Kvantno iskorištenje je bitno za osjetljivost rodopsina na svjetlost. Radi veće osjetljivosti opsin mora vezati kromofor s većim kvantnim iskorištenjem. Osim manjeg kvantnog iskorištenja, reakcija fotoizomerizacije je puno sporija kad se radi o izorodopsinu, nego što je to slučaj kod rodopsina. Brzina fotoizomerizacije drugi je važan čimbenik u procesu vida, gdje detekcija signala i prijenos informacije moraju biti što efikasniji i brži. U čunjićima postoje relativno visoke količine 9-*cis*-retinala u odnosu na štapiće. Moguće evolucijsko rješenje je da se protein s 9-*cis*-retinalom nalazi u čunjićima, ali ne i u štapićima, jer se čunjići aktiviraju pri većem intenzitetu svjetlosti pa je moguće da u čunjićima nisu potrebni kromofori s toliko visokim kvantnim iskorištenjem. Već navedeni enzimi: RPE65, RDH5, CRALBP, DES1 pokazuju slabu specifičnost prema nastajanju 11-*cis*-retinala. Uzrok tome može biti što neki enzimi koji sudjeluju u retinoidnom ciklusu, u organizmu sudjeluju i u drugim procesima, u kojima nisu potrebna svojstva kao što je visoko kvantno iskorištenje. Iako pojedini enzimi u retinoidnom ciklusu ne pokazuju strogu specifičnost prema geometriji nastalog produkta, interakcija s drugim proteinima povećava selektivnost prema nastajanju 11-*cis*-retinala. CRALBP ima ključnu ulogu u selekciji fotoaktivne forme različitih retinoida. Protein–protein interakcije ključne su za stvaranje 11-*cis*-retinala, koji vezan na opsin kao Schiffova baza ima najveće kvantno iskorištenje i najbrže izomerizira od svih stereoizomera retinala. To je vrlo važno u procesu vida, gdje detekcija vizualnog signala mora biti što osjetljivija i gdje prijenos informacije mora biti što brži. Već spomenuti teorijski računi pokazuju da opsin stvara najstabilniji kompleks s 11-*cis*-retinalom, a protein-protein interakcije odgovorne su za nastajanje 11-*cis*-retinala u retinoidnom ciklusu.²²

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. <http://www.msđ-prirucnici.placebo.hr/msđ-za-pacijente/bolesti-ociju/oci-i-vid/gradja-i-funkcija> (datum pristupa 27.4.2018.)
2. D. L. Nelson, M.M. Cox, *Lehninger principles of Biochemistry*, 5th edition, W.H. Freeman and company, New York, 2008, str. 389-399., 461-465.
3. C. K. Garfias, R. Vazquez-Ramirez, B. M. Cabrera-Vivas, B. Gomez-Reyes, J. C. Ramirez, *Photochem. Photobiol. Sci.* **14** (2015) 1660-1672.
4. R. W. Schoenlein, L. A. Peteanu, R. A. Mathies, C. V. Shank, *Science* **254** (1991) 412-415.
5. T. Okada, M. Sugihara, A.N. Bondar, M. Elstner, P. Entel., V. Buss, *J. Mol. Biol.* **342** (2004) 571-583.
6. J. E. Kim, M. J. Tauber, R. A. Mathies, *Biochem.* **40** (2001) 13774-13778.
7. J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, *Organic chemistry*, 2nd edition, Oxford University Press Inc., New York, 2012, str. 148-149.
8. S. Sekharan, K. Morokuma, *J. Am. Chem. Soc.* **133** (2011) 19052-19055.
9. T. Okada, O. P. Ernst, K. Palczewski, K. P. Hofmann, *Trends Biochem. Sci.* **26** (2001) 318-324.
10. V. Buss, M. Sugihara, P. Entel, J. Hafner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **42** (2003) 3245-3247.
11. R. R. Gainetdinov, R. T. Premont, L. M. Bohn, R. J. Lefkowitz, M. G. Caron, *Annu. Rev. Neurosci.* **27** (2004) 107-144.
12. K. Palczewski, J. H. McDowell, P. A. Hargrave, *J. Biol. Chem.* **263** (1988) 14067-14073.
13. C. K. Chen, J. Inglese, R. J. Lefkowitz, J. B. Hurley, *J. Biol. Chem.* **270** (1995) 18060-18066.
14. K. E. Komolov, I. I. Senin, N. A. Kovaleva, M. P. Christoph, V. A. Churumova, I. I. Grigoriev, M. Akhtar, P. P. Philippov, K. W. Koch, *J. Neurochem.* **110** (2009) 72-79.
15. P. A. Hargrave, H. E. Hamm, K. P. Hofmann, *BioEssays* **15** (1993) 43-50.
16. N. Bennet, A. Clerc, *Biochem.* **28** (1989) 7418-7424.
17. A. W. Norton, M. R. D'Amours, H. J. Grazio, T. L. Herbert, R. H. Cote, *J. Biol. Chem.* **275** (2000) 38611-38619.

-
18. J. P. Morth, B. P. Pedersen, M. J. Buch-Pedersen, J. P. Andersen, B. Vilsen, M. G. Palmgren, P. Nissen, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12** (2011) 60-70.
 19. H. F. Altimimi, P. P. M. Schnetkamp, *Channels* **1** (2007) 62-69.
 20. U. B. Kaupp, K. W. Koch, *Annu. Rev. Physiol.* **54** (1992) 153-175.
 21. A. M. Dizhoor, S. Ray, S. Kumar, G. Niemi, M. Spencer, D. Brolley, K. A. Walsh, P. P. Philipov, J. B. Hurley, L. Stryer, *Science* **251** (1991) 915-918.
 22. M. Cascella, S. Bärfuss, A. Stocker, *Arch. Biochem. Biophys.* **539** (2013) 187-195.